

Fakulta textilní TU Liberec

Marcela Cudlínová

Vývoj a biologické testování upravených nanovláknenných vrstev

2011

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ

Vývoj a biologické testování upravených nanovláknenných vrstev

Development and biological testing of modified nanofibrous layers

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. David Lukáš, CSc.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Petr Mikeš

Ostatní konzultanti: Ing. Pavel Kejzlar

Autor práce: Marcela Cudlínová

2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma Vývoj a biologické testování upravených nanovlákných vrstev vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

Souhlasím s umístěním práce ve studovně TUL.

V Liberci dne:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Především Prof. RNDr. Davidovi Lukášovi, CSc. vedoucímu mé bakalářské práce za odborné rady při vedení práce. Dále Ing. Petru Mikešovi za jeho nápady, ochotu a čas strávený při konzultacích. Za připomínky a komentáře k mé práci a za pomoc při analýzách vděčím Ing. Pavlu Kejzlarovi.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Dagmar Matoulkové z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze za její spolupráci a praktické rady.

Návody na cvičení pro předmět Zdravotnické textilie jsou součástí projektu, který je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá vytvářením nanovlákných vrstev pomocí elektrostatického zvlákňování a jejich následného biologického testování. Výzkum byl iniciován rozvojem tkáňového inženýrství, kde je jedním z předpokladů tvorba buněčných nosičů tzv. scaffoldů (z angličtiny – lešení). Teoretická část práce obsahuje souhrn poznatků z oblastí - zdravotnických textilií, vytváření nanovlákných vrstev procesem elektrostatického zvlákňování a významem buněčných kultur. Experimentální část je nejprve zaměřena na výrobu nanovlákné vrstvy procesem elektrostatického zvlákňování. Dále se práce zabývá biologickým testováním připravených nanovlákných vrstev.

Summary

This bachelor thesis is focused on generating of nanofiber layers by means of electrospinning and on subsequent biological testing of these layers. The research was initialized by the development of tissue engineering, in which the production of scaffolds is one of the premises. The theoretical part of the thesis consists of the complex information about these areas – medical textiles, production of nanofiber layers by means of electrospinning and the significance of cell culture. The experimental part is at first focused on producing the nanofiber layers by means of electrospinning and then on the biological testing of prepared nanofiber layers.

Klíčová slova: nanovlákná, elektrostatické zvlákňování, scaffold, tkáňové inženýrství, buněčné kultury, sladinkový agar, pivovarské kvasinky.

Keywords: nanofibers, electrospinning, scaffold, tissue engineering, cell culture, wort agar, brewer's yeast.

Obsah

Úvod.....	7
Teoretická část	9
1.1. Zdravotnické textilie	9
1.1.1. Tkáňové inženýrství.....	12
1.2. Nanovlákná.....	14
1.2.1. Výroba.....	14
1.2.2. Elektrostatické zvlákňování	14
1.2.3. Metody elektrostatického zvlákňování	16
1.2.4. Aplikace elektrostaticky zvlákněných nanovláken	17
1.3. Buněčné kultury	18
1.3.1. Význam buněčných kultur v oblasti výzkumu.....	18
1.3.2. Principy kultivace buněčných kultur	18
1.3.3. Kultivaci buněk in vitro	19
1.3.4. Kultivační média a živné půdy.....	20
1.4. Pivovarské kvasinky.....	23
1.4.1. Druhy pivovarských kvasinek.....	23
2. Experimentální část	25
2.1. Příprava materiálů	25
2.2. Zvlákňování.....	27
Rastrovací elektronový mikroskop.....	30
2.3. Biologické testování.....	31
2.3.1. Testování uvnitř nanovláknenné vrstvy	31
2.3.2. Testování na povrchu nanovláknenné vrstvy.....	36
3. Diskuze výsledků.....	38
4. Závěr	40
5. Seznam literatury	41
6. Seznam obrázků.....	42
7. Seznam tabulek	44
8. Seznam příloh	44

Úvod

„Může být něco krásnějšího než dělat to, co máte rád a vědět, že to má význam?“

Katharine Graham

V současné době je zaznamenáván velký rozvoj netkaných textilií, které nacházejí uplatnění v různých technických oblastech jako je např. zemědělství, stavebnictví, filtrace a zdravotnictví. V oblasti zdravotnictví se netkané textilie uplatňují v několika aplikacích počínaje jednorázovými obleky pro zdravotnický personál, výrobky osobní hygieny až po vývoj biologických náhrad. Problematikou výroby biologických náhrad k obnově či zlepšení funkcí tkání se zabývá tkáňové inženýrství. Pro rozvoj tkáňového inženýrství je nutné vyvíjet buněčné nosiče tzv. scaffoldy, které slouží jako podpůrné konstrukce pro růst buněk. Vzhledem k velikosti buněk se pro výrobu scaffoldů osvědčila nanovlákna, jejichž nespornou výhodou jsou průměry v nanometrech a velký měrný povrch vláken.

Cílem mé práce bylo pomocí elektrostatického zvlákňování vyrobit nanovláknennou vrstvu, která by sloužila jako podpůrná konstrukce pro růst buněk a simulovala by náhradu poškozené tkáně. Modelovými jednobuněčnými organismy pro biologické testování byly zvoleny pivovarské kvasinky. Tyto organismy jsou dostupné, odolné a při práci s nimi nehrozí žádné nebezpečí. Úkolem této bakalářské práce bylo vyrobit nanovláknennou vrstvu, která obsahuje živnou půdu pro pivovarské kvasinky a následně pomocí různých metod ověřit možnost kultivace kvasinek na vyrobené vrstvě nebo uvnitř vrstvy.

V první části práce je zpracována teorie metodou literární rešerše, která obsahuje informace o průzkumu trhu se zdravotnickými textiliemi a dále se zabývá výrobou nanovláken. Součástí teorie jsou také informace o buněčných kulturách a popis pivovarské kvasinky.

Druhá část práce zahrnuje provedené experimenty. Experimentální část se skládá z přípravy materiálů pro elektrostatické zvlákňování, procesu elektrostatického zvlákňování a biologického testování rozděleného na testování uvnitř vrstvy a následně na jejím povrchu.

Shrnutí všech výsledků a návrhy pro dalších experimenty obsahuje kapitola Diskuze výsledků.

Teoretická část

Teoretická část přibližuje problematiku zdravotnických textilií, výroby nanovláken, buněčných kultur obecně, jednobuněčných organismů – pivovarských kvasinek.

1.1. Zdravotnické textilie

Obsah článku je zpracován podle prognózy světového trhu do roku 2010 [1]. Zdravotnické textilie spadají spolu s dalšími textiliemi jako např. agrotextiliemi, geotextiliemi nebo obalovými textiliemi do velké skupiny tzv. Technických textilií.

Technické a netkané textilie představují více než jednu čtvrtinu všech textilních spotřeb z hlediska váhy. I přes zpomalení tempa růstu od počátku tisíciletí mají technické aplikace mnohem pozitivnější výhled než většina ostatních textilních a oděvních odvětví. Spotřeba technických textilií v tabulce 1 je rozdělena podle regionů – je zde uveden objem spotřeby a tempo růstu v letech 1995 – 2010. Objem spotřeby a tempo růstu v letech 1995 – 2010 pro různé aplikace jsou zobrazeny v tabulce 2 [1]. Procentuální podíl objemu spotřeby technických textilií podle aplikace výrobků znázorňuje obr. 1.

Tabulka 1 *Spotřeba technických textilií – objem (udávaný v 1000 tun) a tempo růstu (udávané v %) v letech 1995 – 2010.* [1]

Region	Objem (1000 tun) v letech				Tempo růstu v %		
	1995	2000	2005	2010	95 - 00	00 - 05	05 - 10
Amerika	4,288	5,031	5,777	6,821	3.2	2.8	3.4
Evropa	3,494	4,162	4,773	5,577	3.6	2.8	3.2
Asie	5,716	6,963	8,504	10,645	4.0	4.1	4.6
ROW	0,473	0,558	0,628	0,730	3.3	2.4	3.1
Total	13,971	16,714	19,683	23,774	3.7	3.3	3.8

Technické textilie jsou rozděleny podle aplikací na 12 skupin výrobků. Názvy jednotlivých skupin výrobků jsou převzaty z anglického textu:

Agrotech: zemědělství, lesnictví, rybářství

Buildtech: stavebnictví

Clothtech: funkční součásti obuvi a oblečení

Geotech: geotextilie

Hometech: produkty používané v domácnosti, součásti nábytku a podlahových krytin

Indutech: filtrace a jiné produkty používané v průmyslu

Medtech: hygiena a zdravotnictví

Mobiltech: dopravní konstrukce, zařízení a vybavení

Oekotech: ochrana životního prostředí

Packtech: balení a skladování

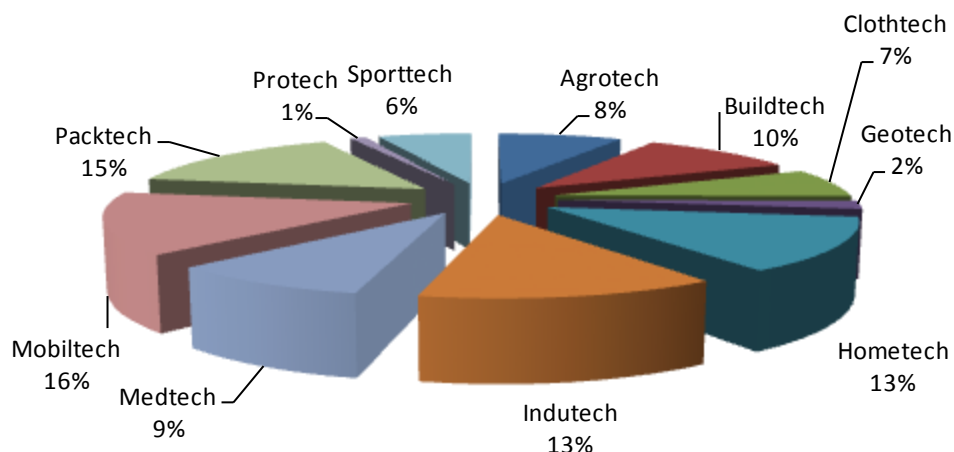
Protech: ochrana osob a majetku

Sporttech: sport a volný čas, technické komponenty

Tabulka 2 *Objem spotřeby (udávaný v 1000 tun) a tempo růstu (udávané v %) v letech 1995 – 2010 pro různé aplikace.*

Oblast aplikace	Objem (1000 tun) v letech				Tempo růstu v %		
	1995	2000	2005	2010	95 - 00	00 - 05	05 - 10
Agrotech	1,173	1,381	1,615	1,958	3,3	3,2	3,9
Buildtech	1,261	1,648	2,033	2,591	5,5	4,3	5,0
Clothtech	1,072	1,238	1,413	1,656	2,9	2,7	3,2
Geotech	0,196	0,255	0,319	0,413	5,4	4,6	5,3
Hometech	1,864	2,186	2,499	2,853	3,2	2,7	2,7
Indutech	1,846	2,205	2,264	3,257	3,6	3,5	4,4
Medtech	1,228	1,543	1,928	2,380	4,7	4,6	4,3
Mobiltech	2,117	2,479	2,828	3,338	3,2	2,7	3,4
Packtech	2,189	2,552	2,990	3,606	3,1	3,2	3,8
Protech	0,184	0,238	0,279	0,340	5,3	3,3	4,0
Sporttech	0,841	0,989	1,151	1,382	3,3	3,1	3,7
Celkem	13,971	16,714	19,683	23,774	3,7	3,3	3,8

V oblasti MedTech (hygiena a zdravotnictví) je tempo růstu nadprůměrné a pravděpodobně nabízí největší prostor pro rozvoj textilií nejvyšších hodnot pro specializované aplikace.



Obrázek 1 *Procentuální podíl objemu spotřeby technických textilií podle aplikace výrobků.* Zdravotnické textilie tvoří velkou skupinu výrobků jako např. chirurgické nitě, obvazové materiály, obleky pro zdravotnický personál, ortézy, výrobky osobní hygieny, zdravotní matrace, umělé cévy a náhrady a scaffoldy pro tkáňové inženýrství (kterému je věnován následující odstavec).

1.1.1. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství se zabývá vývojem biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání. Impulzem pro tkáňové inženýrství byl hlavně nedostatek orgánů vhodných pro transplantaci. V tomto odvětví je vyvíjena velká snaha vytvářet tkáně nebo dokonce i celé orgány z buněk na vhodném nosiči. Osídlením vlastními buňkami se potlačí imunologické reakce a odpadnou pooperační komplikace. S problematikou tkáňového inženýrství je možné se blíže seznámit v [2, 3].

Konstrukcí umělé tkáně se zabývá biomedicínské inženýrství. Tkáň lze vytvořit osídlením části tkáně buď *in vivo* (z latiny – v přirozeném prostředí v živém organismu) nebo *in vitro* (z latiny – ve skle, kultivace v umělých podmínkách mimo živý organismus).

Základním předpokladem pro rozvoj tkáňového inženýrství jsou kvalitní buněčné nosiče tzv. scaffoldy. Scaffold je podpůrná konstrukce pro růst buněk a celých tkání.

Pro výrobu scaffoldů se osvědčily netkané textilie. Mezi hlavní výhody netkaných textilií patří náhodná orientace vláken, možnost tvorby trojrozměrných struktur, velká porozita (pro dobré pronikání buněk do scaffoldu), velikost a povrch vláken pro dobrou adhezi buněk.

Vzhledem k velikostem buněk je třeba vyrábět scaffoldy v rozměrech nanometrů. Čím jsou vlákna jemnější, tím poskytují větší specifický povrch ve vztahu k objemovému podílu a jsou proto vhodné k výrobě scaffoldů.

1.2. Nanovlákná

Nanovlákná jsou textilní vláknenné útvary, jejichž průměr je menší než 1 μm . Pro jejich výrobu se používají různé syntetické i přírodní polymery. Nanovlákná jsou označována jako materiály třetího tisíciletí a jsou přínosem hlavně v medicíně, elektronice, filtraci a v ochraně životního prostředí [4].

1.2.1. Výroba

Nanovlákná vyrobená elektrostatickým zvlákňováním se vyznačují mimořádnými vlastnostmi jako je velký měrný povrch (poměr povrchu vlákna k jeho objemu) a velká pórovitost vláknenné vrstvy s malými rozměry pórů.

Nanovlákná lze vyrobit několika způsoby [5]:

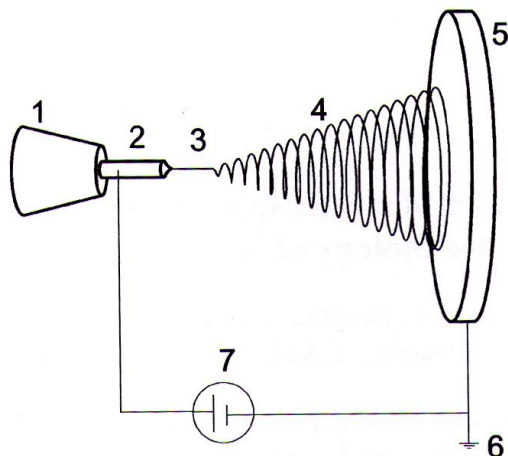
- Dloužení
- Podložková syntéza
- Fázová separace
- Samo-organizování
- Elektrostatické zvlákňování
- Centrifugací

1.2.2. Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je způsob přípravy ultra jemných vláken z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny. Ke zvlákňování dochází účinkem elektrostatických sil působících na zvlákňovaný materiál.

V procesu elektrostatického zvlákňování je využito vysokého napětí k vytvoření elektrické síly působící na hladinu polymerního roztoku nebo taveniny. Zvlákňovaný polymerní roztok je přímo spojen s elektrodou vysokého napětí např. pomocí kapiláry (trysky). Mezi špičkou kapiláry a uzemněným kolektorem působí vysoké elektrické

pole v řádu desítek kV, následkem čehož je na povrchu kapaliny indukován elektrický náboj. Relaxací indukovaného náboje vzniká na výstupu ze zvlákňovací trysky tzv. Taylorův kužel, ze kterého je vytlačována nabitá kapalina ve formě vláken submikronových rozměrů [6, 7]. Schéma procesu je znázorněno na obr. 2. Vzniklá vlákna po odpaření rozpouštědla tuhnou a tvoří nanovláknennou vrstvu na povrchu kolektoru.



Obrázek 2 Schéma elektrostatického zvlákňování [6]. (1) stříkačka s dávkovací pumpou, (2) kapilára sloužící jako elektroda, (3) stabilní část zvlákňování, (4) zóna bičování, (5) kolektor, (6) uzemnění, (7) vysoké napětí.

Hlavní parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování jsou:

- elektrické napětí,
- koncentrace a viskozita polymerního roztoku,
- molekulová hmotnost polymerního roztoku,
- povrchové napětí polymerního roztoku,
- procesní vzdálenost kapilára – kolektor,
- obsah aditiv v polymerním roztoku,
- vlhkost vzduchu.

Vliv jednotlivých parametrů je blíže popsán např. v [5].

1.2.3. Metody elektrostatického zvlákňování

Všechny metody elektrostatického zvlákňování jsou založeny na stejném principu. Liší se v konstrukci, dávkování, kontinuitě apod. Níže uvedené metody [5] jsou pro polymerní roztoky nejpoužívanější.

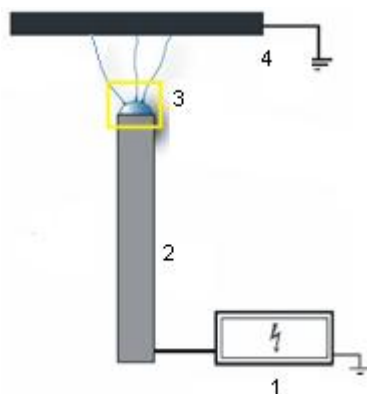
1. Zvlákňování z „tyčky“.

Principiálně nejjednodušší zařízení, jehož schéma je na obr. 3. se skládá z kovové tyčky připojené ke zdroji vysokého napětí, uzemněného kolektoru a zdroje vysokého napětí. Polymerní roztok je dávkován na plošku tyčky a následně díky vysokému napětí zvlákňován na uzemněný kolektor. Na kolektoru vzniká nanovláknenná vrstva.

Toto zařízení bylo použito pro experimentální část bakalářské práce.

Parametry procesu: teplota [°C] a vlhkost vzduchu [%] v laboratoři, vzdálenost kolektoru [cm], použitý typ polymeru, kritické napětí [kV] (napětí, při kterém se začíná polymer zvlákňovat) a napětí při zvlákňování [kV].

Tato metoda neprobíhá kontinuálně, takže je pro průmyslovou výrobu nevhodná.



Obrázek 3 Schéma zvlákňování z tyčky. (1) zdroj vysokého napětí, (2) kapilára, (3) Taylorovy kužely tvořené z kapky roztoku, (4) uzemněný kolektor.

2. Zvlákňování z „trysky“

Zařízení se skládá z injekční stříkačky s polymerem, jehly, dávkovací pumpy a kolektoru (viz obr. 2). Polymer je vytlačován z injekční stříkačky pomocí dávkovací pumpy. Na špičce jehly se tvoří tzv. Taylorův kužel a vznikající vlákna dopadají na uzemněný kolektor, kde se tvoří nanovláknenná vrstva.

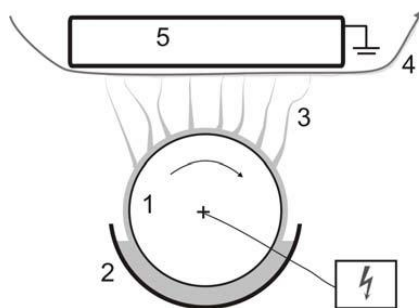
Parametry procesu: teplota [°C] a vlhkost [%] v laboratoři, vzdálenost kolektoru [cm], použitý typ polymeru, kritické napětí [kV] a dávkování [ml/hod].

3. Zvlákňování z „válečku“ – technologie Nanospider

Zařízení se skládá z polymerní lázně, válečku, do kterého je přivedeno vysoké napětí a kolektoru (viz obr. 4).

Z poloviny ponořený váleček se brodí v polymerní lázni a vlivem elektrostatického pole se na povrchu válečku tvoří několik Taylorových kuželů na tenkém filmu polymerního roztoku. Uchycením vláken na kolektoru vzniká nanovláknenná vrstva.

Tato metoda je kontinuální a je průmyslově využívána.



Obrázek 4 *Technologie nanospider*. (1) váleček do kterého je přivedeno vysoké napětí, (2) lázeň s polymerním roztokem, (3) vznikající nanovláknna, (4) podkladová textilie, (5) uzemněný kolektor.

1.2.4. Aplikace elektrostaticky zvlákněných nanovláken

Nanovláknna jsou využitelná v mnoha oborech, jako např. v medicíně, elektronice, automobilovém průmyslu, filtraci, ochraně životního prostředí, nanokompozitech apod.

Příklady aplikací [5]:

- Kompozity
- Filtrace
- Biomedicínské aplikace
- Protetika
- Antiadhezní membrány
- Podložky pro růst tkání

1.3. Buněčné kultury

Kultury rostlinných a živočišných buněk se již dlouho využívají k různým výzkumným účelům např. k vývoji léků a vakcín. Tato skutečnost umožňuje omezení pokusů na zvířatech. Následující text je zpracován dle [8], kde je toto téma popsáno blíže.

1.3.1. Význam buněčných kultur v oblasti výzkumu

Buněčné kultury dnes patří mezi nejpoužívanějších biologické modely používané ve výzkumu a jako zdroj materiálu v biotechnologických aplikacích.

Mezi výhody výzkumu s buněčnými kulturami patří např. možnost práce jen s jediným typem buněk, které jsou dobře definované.

Nevýhodou je, že se buňky kultivují za jiných podmínek než je jejich obvyklé prostředí v tkáních a někdy mohou během kultivace ztratit či změnit svou specializaci. Práce s buněčnými kulturami vyžaduje vhodně vybavenou laboratoř, zvláštní spotřební materiál a chemikálie.

1.3.2. Principy kultivace buněčných kultur

Izolací určitého typu buněk ze zvířete, člověka či rostliny se zakládá primokultura. Buňky se kultivují nejčastěji na vhodném povrchu, méně často v suspenzi. Kultivační podmínky se snaží napodobit fyziologické podmínky *in vivo*. Buňky rostou v kultivačním médiu ve speciálních nádobách např. v Petriho miskách. Pokud se pěstují jako adherentní (=přirostlá) kultura, jsou důležité vlastnosti povrchu kultivační nádoby. Po namnožení se adherentní buňky uvolní od kultivačního povrchu a naředěná buněčná suspenze se nasadí do nové kultivační nádoby (subkultura). Počet buněk u většiny linií roste přibližně exponenciálně až do okamžiku, kdy se buňky začnou těsně dotýkat. V důsledku kontaktní inhibice pak dochází ke zpomalení až zastavení růstu. Většina adherentních kultur nakonec vytvoří na povrchu kultivační nádoby splývající vrstvu. Kultivované buňky mohou mít omezenou životnost (stárnou a jejich další dělení se postupně zastaví), nebo lze pracovat s tzv. kontinuálními liniemi (schopnost nekonečného pomnožování *in vitro*). Výzkumné laboratoře mohou připravovat vlastní buněčné linie z primokultur, nebo je nakoupit ze sbírek.

Častým úkolem bývá stanovení počtu buněk. Používají se techniky založené na přímém počítání pod mikroskopem, průtokové počítáče buněk, kvantifikace buněk podle koncentrace vybraných látek či podle aktivity některých enzymů. Živé buňky lze dlouhodobě skladovat zmražené kapalným dusíkem nebo v hlubokomrazícím boxu.

1.3.3. Kultivaci buněk in vitro

Práce s tkáňovými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu.

Základem pro práci s buněčnými kulturami je dokonalé zvládnutí sterilní pracovní techniky a kontrola kontaminace. Některé běžně používané sterilizační metody nejsou vždy vhodné pro různé buňky [8].

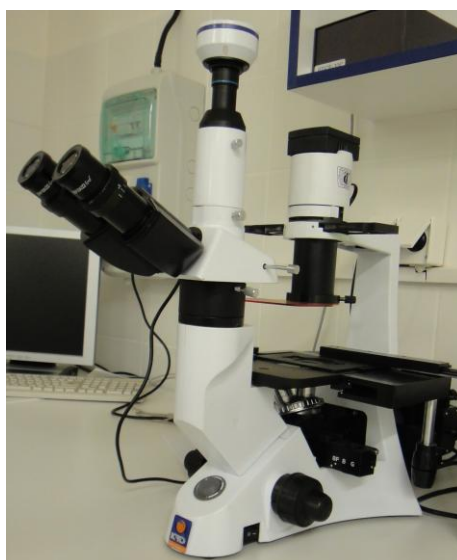
Mezi základní zařízení, kterým disponuje i nová laboratoř na katedře netkaných textilií, kde probíhala experimentální část, patří: laminární box (obr. 5), inkubátor s řízenou teplotou (obr. 6) a inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem (obr. 7). Používá se sterilní jednorázový plast, kultivační nádoby a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami.



Obrázek 5 Laminární box zn. TELSTAR.



Obrázek 6 Inkubátor s řízenou teplotou zn. MELAG



Obrázek 7 Inverzní mikroskop

1.3.4. Kultivační média a živné půdy

Druhů kultivačních médií je dnes několik desítek. Zpravidla obsahují zdroje energie, aminokyseliny, vitamíny a růstové faktory [9].

2.2.4.1. Rozdělení živných půd dle [9]

a) podle původu

- přirozené (mléko, brambor, krevní sérum aj.)
- umělé (uměle připravované, ale chemicky nepřesně definované - jde o většinu půd užívaných v bakteriologické diagnostice)
- syntetické (půdy s přesně známým chemickým složením, umožňující např. studium metabolismu)

b) podle konzistence

- tekuté (pomnožovací) - které dobře pomnožují, ale nehodí se k získávání čisté kultury
- pevné (agarové) - tekuté půdy zahuštěné agarem (1,5-2%) nebo želatinou, případně koagulací bílkovin teplem (krevního séra, vaječné hmoty apod.). Jsou vhodné k izolaci čistých kultur (izolační půdy).
- polotuhé (semisolidní) s přidavkem 0,1 až 0,5 % agaru

c) podle obsahu živin

- základní - slouží ke kultivaci řady běžných bakterií a jsou východiskem pro přípravu ostatních půd.
- obohacené - základní půdy s příměsí růstových faktorů ve formě různých extraktů, hydrolyzátů, krve, séra apod.

d) podle účelu použití

- univerzální - hodící se k zachytu a izolaci většiny medicínsky významných bakterií
- selektivní (výběrové, elektivní) - základní půda (živný základ) do níž přidáme inhibiční složku, která ve směsi bakterií potlačí bakterie nežádoucí a umožní dobrý růst hledané skupiny nebo druhu bakterií. Sem můžeme zařadit tekuté

půdy k pomnožení některých patogenů z klinického materiálu (např. pomnožovací půdy pro salmonely a další).

- diagnostické - k základní půdě se přidává diagnostická přísada, jež se metabolismem mikroba charakteristicky mění (chemicky a barevně), nebo rozkladné produkty odhalí vhodný indikátor, přidaný již přímo do půdy, nebo přidaný po určité době inkubace k narostlé kultuře. Jde zejména o větší počet půd, používaných v tzv. "pestré řadě" při určování biochemické aktivity izolovaného kmene.
- výběrově-diagnostické - jsou kombinací dvou předchozích. Jde většinou o pevná média s živným základem, výběrově inhibiční složkou a diagnostickou přísadou, doplněná vhodným indikátorem. Sem patří řada půd používaných k izolaci některých patogenů.
- transportní média – slouží k ochraně vzorku, nejčastěji ve formě vatového tamponu, po dobu od odběru do okamžiku zpracování v laboratoři.

2.2.4.2. Živná půda pro kultivaci pivovarských kvasinek

Pro kultivaci pivovarských kvasinek se používá sladinkový agar, který obsahuje všechny potřebné živiny a minerální látky pro tento druh buněk. Sladinkový agar je sypká směs obsahující maltový extrakt, pepton, maltózu, dextrin, glycerol a agar.

Agar je přírodní [polysacharid](#) (lineární [polymer galaktózy](#)) s vysokou gelující schopností, který se vyrábí z červených mořských řas rodu [Floridae](#). Používá se jako [živné médium](#) pro kultivaci [mikroorganismů](#) a [rostlin](#). Taje při +96 °C a tuhne při +40 °C [10].

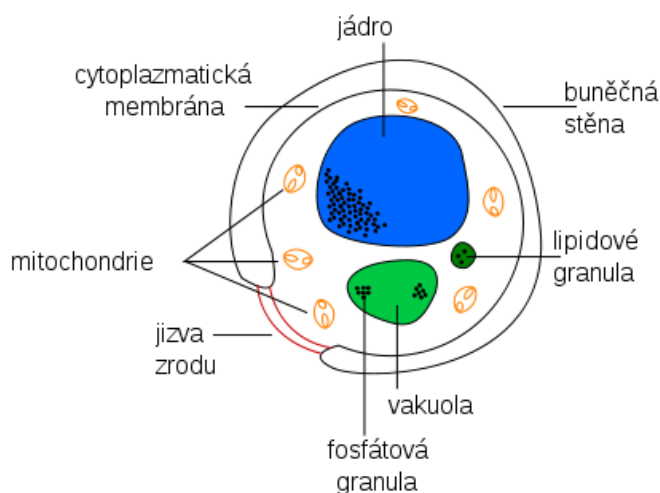
Příprava sladinkového agaru – WORT AGAR zn. OXOID

[V 1 litru destilované vody se rozpustí 50g agaru, přivede se k varu a sterilizuje se v autoklávu za teploty 121°C po dobu 15 min.](#) Sladinkový agar má gelující schopnost, s klesající teplotou tuhne.

1.4. Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky patří mezi eukaryotické buňky, kde rozlišujeme eukaryotické buňky [hub](#), [rostlin](#) a [živočichů](#).

Kvasinky jsou [jednobuněčné organismy](#) řazené do říše hub, oddělení hub vřeckovýtrusých [11]. Stavba kvasinky je popsána na obr. 8.



Obrázek 8 Stavba kvasinky [11].

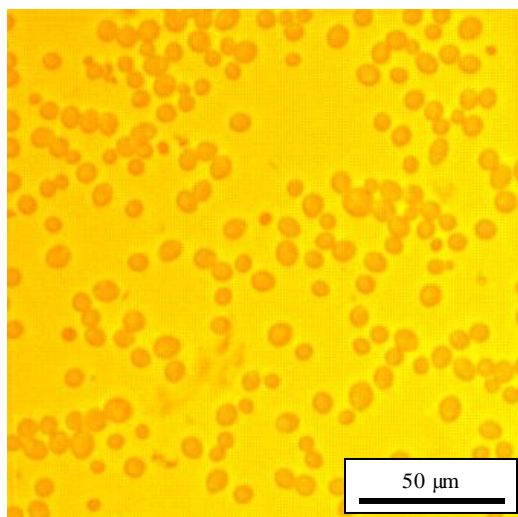
1.4.1. Druhy pivovarských kvasinek

Existují tzv. svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jejichž název vznikl od toho, že po proběhnutí kvašení je většina jejich buněk vynášena na povrch fermentační kapaliny a tvoří na ní hustou pěnu. Naproti tomu tzv. spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* (obr. 9) se v konečné fázi shlukují ve vločky a sedimentují na dně kvasné nádoby [12].

Pivovarské kvasinky mají schopnost přeměňovat zkvasitelné [cukry](#) na [ethanol](#) (alkohol) a [oxid uhličitý](#). Kromě těchto hlavních produktů [metabolismu](#) vytvářejí i řadu vedlejších [metabolitů](#) jako jsou [estery](#), [vyšší alkoholy](#) a [kyseliny](#), které jsou významné pro vlastnosti piva [13].

Lisované pивní kvasinky se dále prodávají jako pekařské droždí a umožňují kynutí těsta. Mají vysoký obsah vitamínů skupiny B proto slouží k výrobě léčiv, kde pomáhají zvyšovat imunitu, předcházet kožním problémům apod. Dále se přidávají do krmných směsí apod.

Pro experimentální část této práce bylo pro testování použito spodních kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis*.



Obrázek 9 Buňky kvasinek (*Saccharomyces carlsbergensis*).

Při výrobě Pilsner Urquell se uplatňuje speciální kmen kvasinek, který se využívá už od roku 1842. Tento originální kmen kvasinek se uchovává v chlazeném trezoru.

2. Experimentální část

Experimentální část se skládá z přípravy materiálů pro elektrostatické zvlákňování, procesu elektrostatického zvlákňování a biologického testování vyrobených nanovláknenných vrstev.

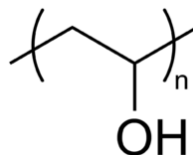
2.1. Příprava materiálů

Elektrostatickému zvlákňování předcházela příprava zvlákňovaných roztoků. Cílem bylo připravit roztok s nejvyšším hmotnostním procentem sladinkového agaru a zároveň vytvořit nanovláknennou vrstvu bez velkých defektů.

Pro elektrostatické zvlákňování byly zvoleny dva materiály:

- Polyvinylalkohol (dále jen PVA) - ve vodě rozpustný syntetický polymer, který je vhodný k elektrostatickému zvlákňování. Pro experiment byl použit PVA značky Sloviol R (Chemické závody Nováky).

Strukturní vzorec:



- Sladinkový agar – sypká směs z maltového extraktu, agaru (přírodní polysacharid vyráběný z červených mořských řas), dextrinu, maltózy, glycerolu a dalších látek. Pro experiment byl použit agar pod obchodním názvem **WORT AGAR** značky OXOID.

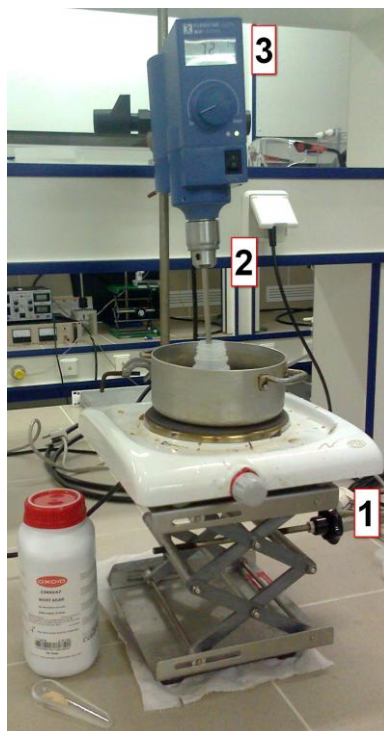
Postup:

1. Příprava vodných roztoků PVA zředěním 16% PVA při hmotnosti roztoku 20g (viz tab. 3).

Tabulka 3 *Hmotnostní podíly PVA a vody při přípravě 20 g roztoku.*

hmotnostní procento PVA [%]	hmotnostní podíl PVA [g]	hmotnostní podíl vody [g]
16	3,2	16,8
12	2,4	17,6
10	2	18
8	1,6	18,4

2. Zahřívání připravených roztoků ve vodní lázni (obr. 10) a postupné přidávání naváženého množství sypkého sladinkového agaru do roztoku PVA.
3. Pomocí hřídelového míchadla rozmíchání a rozpuštění agaru v roztoku PVA za varu lázně.



Obrázek 10 *Příprava roztoků.* (1) elektrický vaříč, (2) roztok v lázni, (3) hřídelové míchadlo.

2.2. Zvlákňování

K výrobě nanovláknenné vrstvy pomocí elektrostatického zvlákňování bylo použito zařízení pro zvlákňování z tyčky (obr. 11) přivedené ke zdroji vysokého napětí značky Spellman SL 150.



Obrázek 11 *Zařízení pro zvlákňování z tyčky.* (1) přívod ke zdroji vysokého napětí, (2) kapilára, (3) kolektor, (4) uzemnění.

Parametry elektrostatického zvlákňování:

Teplota vzduchu v laboratoři byla 19,5°C a relativní vlhkost vzduchu 45%. Protože laboratoř zatím nedisponuje potřebným vybavením pro zajištění konstantní vlhkosti a teploty během procesu elektrostatického zvlákňování, nebylo možné při přípravě všech vzorků udržet tyto parametry konstantní. Získaná data jsou proto jen orientační. Dalším parametrem je vzdálenost kolektoru od kapiláry, která byla 10 cm.

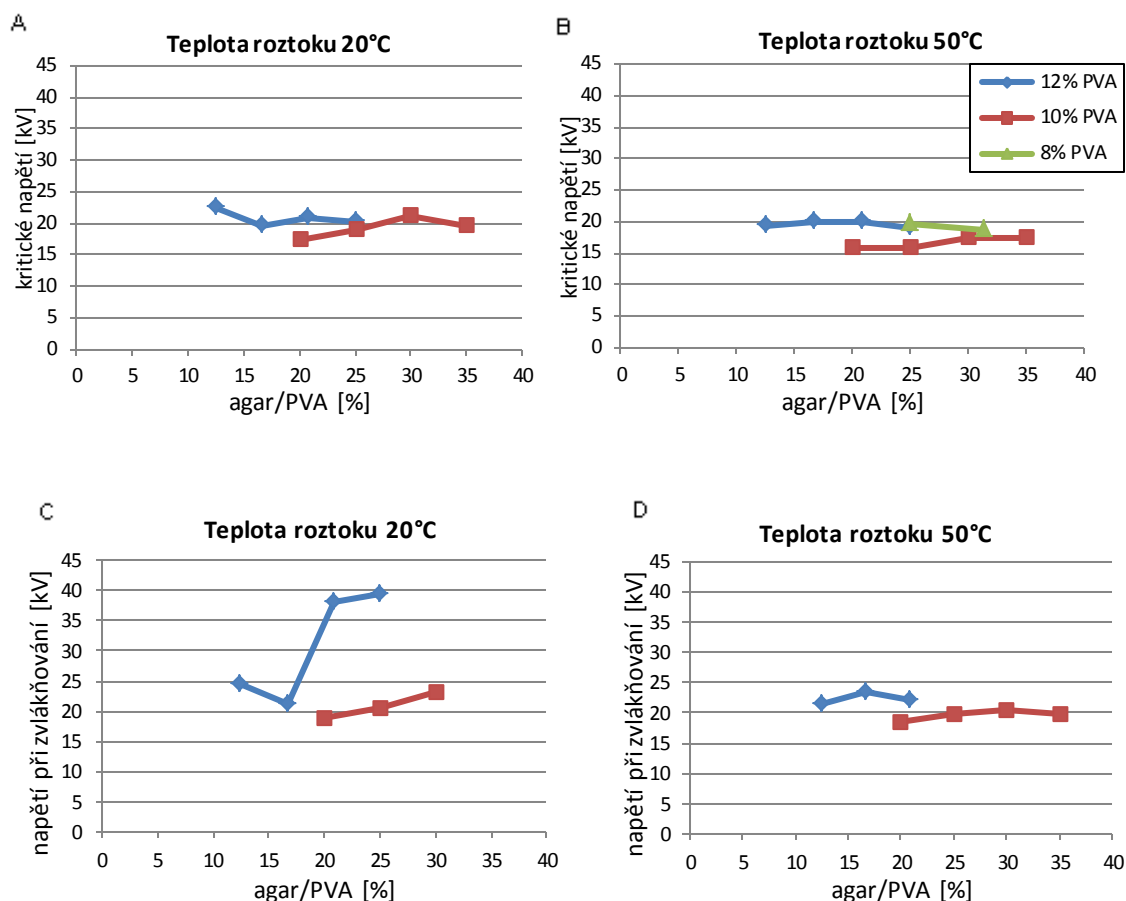
Hmotnostní podíly PVA a sladinkového agaru v 20 g roztoku, kritické napětí a napětí při kterém byl roztok zvlákněn, jsou uvedeny v tabulce 4. Připravené roztoky byly zvláknovány za teploty 50°C a 20°C.

Tabulka 4 *Hmotnostní podíly PVA a sladinkového agaru v 20 g roztoku, kritické napětí a napětí při zvláknování.*

číslo vzorku	PVA [%]	hmotnost sušiny PVA [g]	hmotnost agaru [g]	poměr agar/sušiny a PVA [%]	teplota roztoku [°C]	kritické napětí [kV]	napětí při zvláknování [kV]
1	12	2,4	0,3	12,5	50	19,2	21,5
					20	22,6	24,6
2	12	2,4	0,4	16,7	50	19,8	23,6
					20	19,5	21,3
3	12	2,4	0,5	20,8	50	19,9	22,1
					20	20,9	38
4	12	2,4	0,6	25	50	19,1	23
					20	20,2	39,4
5	10	2	0,4	20	50	15,8	18,4
					20	17,2	19
6	10	2	0,5	25	50	15,9	19,9
					20	18,9	20,5
7	10	2	0,6	30	50	17,5	20,6
					20	21,3	23,3
8	10	2	0,7	35	50	17,3	19,8
					20	19,7	-
9	8	1,6	0,4	25	50	19,5	-
					20	-	-

10	8	1,6	0,5	31,3	50	18,8	-
					20	-	-

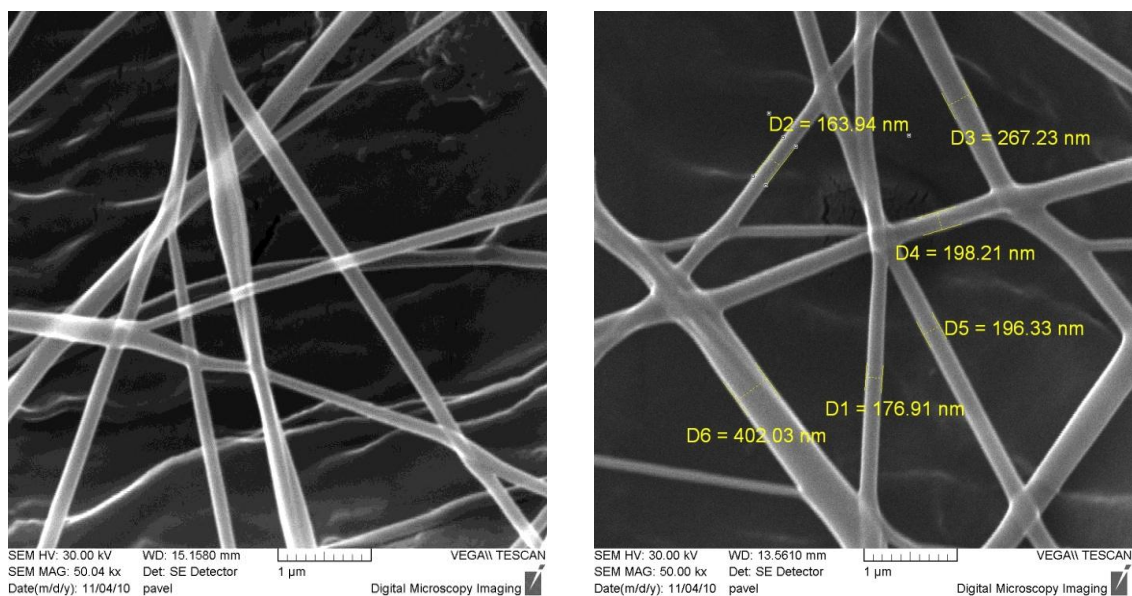
Z hodnot uvedených v tab. 4 byly vypracovány grafy na obr. 12.



Obrázek 12: A - Závislost kritického napětí na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 20°C. B - Závislost kritického napětí na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 50°C. C - Závislost napětí při zvlákňování na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 20°C. D - Závislost napětí při zvlákňování na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 50°C.

Z obr. 12-A a 12-B vyplývá, že při teplotě roztoků 50°C lze dosáhnout nižšího napětí při kritickém zvlákňování než při teplotě roztoků 20°C. Zároveň při teplotě 50°C bylo zaznamenáno kritické napětí u vzorku 9 a 10 (z tab. 4) až do hmotnostního podílu roztoku 31,3% agar/PVA.

Při srovnání obr. 12-C a 12-D je nižší napětí při zvlákňování také u roztoků s teplotou 50°C. Při této teplotě roztoku byl zvlákněn vzorek 8 (viz tab. 4) s nejvyšším hmotnostním procentem agar/PVA 35%. Při teplotě roztoku 20°C se jevil nejvhodnější vzorek 7 (viz tab. 4), kde bylo dosaženo hmotnostního procenta agar/PVA 30%. Morfologie nanovláken vrstvy tohoto vzorku je na obr. 13. Snímky byly pořízeny rastrovacím elektronovým mikroskopem Tescan VEGA II XMU (obr. 14).



Obrázek 13 Snímky nanovláknenné vrstvy ze vzorku 7 (viz tab.4) z elektronového rastrovacího mikroskopu.

Rastrovací elektronový mikroskop

Pro pozorování elektrostaticky zvlákněných struktur byl využit rastrovací elektronový mikroskop Tescan VEGA II XMU vybavený modulem QUANTAX Bruker pro lokální energiově-disperzní chemickou analýzu. Vzorky byly pozorovány pomocí detektoru sekundárních elektronů, který poskytuje pohled na vzorek v topografickém kontrastu. Aby bylo zabráněno kumulaci elektrostatického náboje, byl povrch vzorků před pozorováním zvodivěn vakuovým naprášením vrstvičky Au-Pd.



Obrázek 14 Rastrovací elektronový mikroskop Tescan VEGA II XMU použitý pro pozorování morfologie zvlákněného materiálu.

2.3. Biologické testování

Ke kultivaci kvasinek je vždy nutný přenos kvasinek z uchovávacího média, v tomto případě ze šikmého agaru na nové pevné nebo tekuté médium. Tomuto procesu se říká očkování a existuje několik metod. Ve spolupráci s paní Mgr. Dagmar Matoulkovou z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze byly zpracovány základní metody očkování a práce s kvasinkami a vytvořeny návody na cvičení pro předmět Zdravotnické textilie (viz příloha).

Některých z metod bylo využito pro experimentální část této bakalářské práce. Byla aplikována např. metoda Stanovení počtu kvasničných buněk v Bürkerově komůrce (viz příloha).

Bylo vyzkoušeno několik metod, jak vytvořit nanovláknennou vrstvu vhodnou k množení buněk – pivovarských kvasinek. Testování růstu buněk probíhalo dvěma způsoby - uvnitř nanovláknenné vrstvy a na povrchu nanovláknenné vrstvy.

2.3.1. Testování uvnitř nanovláknenné vrstvy

Pokus si kladl za cíl elektrostaticky zvláknit roztok PVA s dispergovanými pivovarskými kvasinkami a následnou kultivaci kvasinek přímo ve vyrobené vrstvě. Testování probíhalo dvěma způsoby – zvláknění roztoku PVA bez přídavku sladinkového agaru a zvláknění roztoku PVA s přídavkem sladinkového agaru.

Zvláknění kvasinek v roztoku PVA

Cílem bylo zjistit, zda lze pomocí elektrostatického zvláknění vyrobit nanovláknna, která budou obsahovat pivovarské kvasinky. Za předpokladu, že vyrobená nanovláknna budou obsahovat kvasinky, prokázat zda jsou kvasinky po tomto procesu schopny kultivace.

Parametry elektrostatického zvlákňování:

Teplota v laboratoři byla 23°C a relativní vlhkost vzduchu 36%. Vzdálenost kolektoru od kapiláry byla 10 cm. Jako polymer pro zvlákňování byl zvolen 10% vodný roztok PVA. Hodnota kritického napětí byla 19 kV a napětí při zvlákňování dosahovalo hodnoty 22 kV.

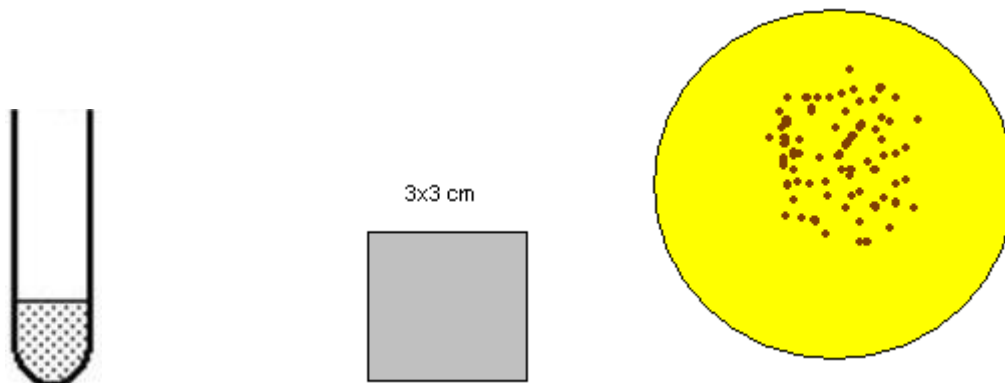
Postup:

1. Příprava 20 ml 10 % vodného roztoku PVA (viz tab. 3).
2. Buněčná kultura namnožená na živné půdě byla setřena očkovací kličkou a vmíchána do 10 % roztoku PVA.
3. Pro stanovení počtu kvasničných buněk v 1ml roztoku byla použita Bürkerova komůrka (obr. 18).
4. Připravený roztok byl zvlákněn metodou elektrostatického zvlákňování z tyčky (obr. 11) při napětí 22 kV. Jako podklad pro ukládání nanovlákněné vrstvy byla použita hliníková fólie (pro snadnější přenesení uložené nanovlákněné vrstvy).
5. Část vytvořené nanovlákněné vrstvy – 9 cm² byla přenesena z podkladové fólie na živnou půdu ze sladinkového agarů v Petriho misce. Vzorek byl uložen na 72 hodin v inkubátoru při teplotě 27°C.
6. Zvážením byla vypočítána hmotnost nanovlákněné vrstvy.
7. Po 72 hodinách kultivace v inkubátoru byly spočítány vytvořené kolonie.
8. Část nanovlákněné vrstvy byla pozorována rastrovacím elektronovým mikroskopem (obr. 16 a 17).

Výsledky:

Stanovením počtu buněk v Bürkerově komůrce bylo zjištěno, že 1 ml 10% vodného roztoku PVA obsahuje 5 250 000 kvasničných buněk (obr. 15 A). Zvážením zvlákněné vrstvy byla zjištěna hmotnost testované vrstvy 0,00211 g (15 B). Přenesením vytvořené nanovlákněné vrstvy na agarovou půdu došlo k rozpuštění PVA vláken. Po 72 hodinách kultivace za teploty 27°C se na živné půdě vytvořily zřetelné kolonie kvasinek (obr. 15 C).

Za předpokladu, že z 1 životaschopné buňky vyrůstá 1 kolonie, bylo prokázáno, že z hmotnosti nanovlákněné vrstvy 0,00211 bylo životaschopných kvasničných buněk po kultivaci průměrně 54. Schematický postup vyhodnocení je na obr. 15.



1ml = 5 250 000 buněk $m = 0,00211 \text{ g}$, $m_s = 2,34 \frac{\text{g}}{\text{m}^2}$ 54 kolonií kvasinek

A

B

C

Obrázek 15 *Schématický postup vyhodnocení testování uvnitř vrstvy*. A – vodný roztok PVA obsahující kvasinky. B – Rozměr a hmotnost testované vrstvy. C – Narostlé kolonie po 72 hodinách v inkubátoru.

Vyhodnocení:

Hmotnost vyrobené nanovlákně vrstvy 0,00211 g.

10% vodný roztok = $0,00211 \times 10 = 0,0211 \text{ g}$

Převod z hmotnostní jednotky na objemovou:

Hustota 10% vodného roztoku PVA je přibližně $1,03 \text{ g/cm}^3$ (g/ml)

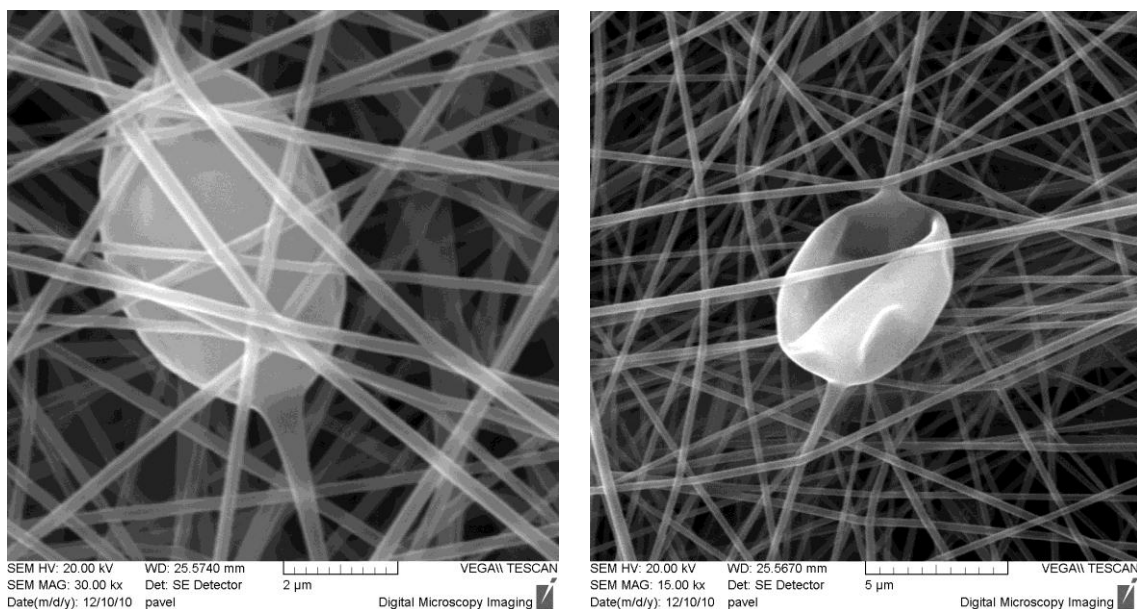
$$V = \frac{m}{\rho}$$

$$V = \frac{0,0211}{1,03} = 0,0205 \text{ ml}$$

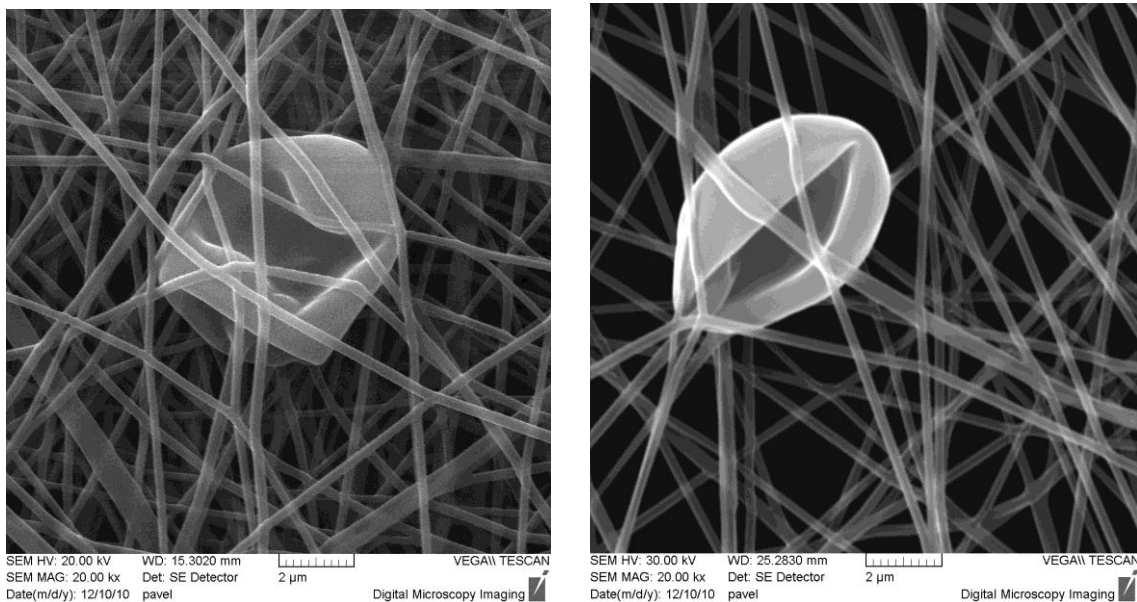
V 1 ml vodného roztoku PVA bylo 5 250 000 kvasničných buněk, v objemu 0,0205 ml vodného roztoku PVA jich tedy bylo 107 625.

Procento zvlákněných a přeživších kvasničných buněk bylo 0,05 %

Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (viz podkapitola 2.2, obr. 11) ukázaly, že vytvořená nanovláknenná vrstva obsahovala kvasinky. Kvasničné buňky byly buď přímo uvnitř nanovlákn (obr. 16), nebo byly pouze vytaženy nanovláknky a uchyceny následně vytvořenou vrstvou (obr. 17).



Obrázek 16 Buňky pivovarské kvasinky uvnitř nanovlákn

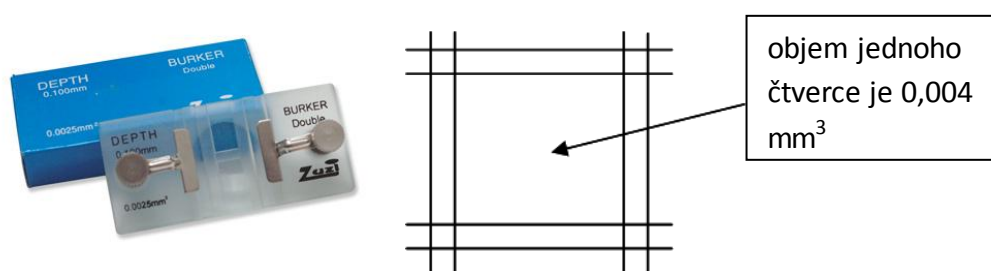


Obrázek 17 Buňky pivovarské kvasinky v nanovláknenné vrstvě.

Zařízení pro počítání množství kvasinek v roztoku PVA:

Bürkerova komůrka

Slouží ke stanovení počtu kvasničných buněk. Bürkerova komůrka je mikroskopické sklíčko s vybroušenou mřížkou. Mřížka má definované rozměry a dělí se na tzv. komůrky o dané hloubce. Prostor mezi podložním a krycím sklíčkem má tak přesně definovaný objem. Pro experiment byla používána komůrka s plochou čtverečku $0,04 \text{ mm}^2$ a hloubkou $0,1 \text{ mm}$. Objem nad každým čtverečkem je tedy $0,004 \text{ mm}^3$. Počet kvasinek je pak možné dopočítat na objem 1 ml .



Obrázek 18 *Bürkerova komůrka.*

Zvlákňování kvasinek v roztoku PVA s přidavkem sladinkového agaru

Z předchozího experimentu bylo zjištěno, že kultivace kvasinek v samotném vodném roztoku PVA nenastala, protože nebyla poskytnuta buňkám živná půda.

Cílem dalšího experimentu bylo vytvořit nanovláknenné prostředí vhodné ke kultivaci kvasinek. Přídavek sladinkového agaru měl zajistit kvasinkám živiny potřebné k jejich množení.

Parametry elektrostatického zvlákňování:

Teplota vzduchu v laboratoři byla 22°C a relativní vlhkost 38%. Vzdálenost kolektoru od kapiláry byla 10 cm . Použitý typ polymeru - 10% vodný roztok PVA s přidavkem sladinkového agaru v hmotnostním poměru 25% agar/PVA. Kritické napětí bylo 20 kV a napětí při zvlákňování dosáhlo 23 kV .

Postup:

1. Příprava 10% roztoku PVA (tab. 3).
2. Připravený roztok byl postupně zahříván v lázni a za stálého míchání byl přisypáván sladinkový agar dokud nedošlo k důkladnému rozmíchání. Po té, co lázeň prošla varem, byl roztok zchlazen na teplotu 27°C, aby do něj mohly být přimíchány kvasinky.
3. Buněčná kultura byla vnesena a rozmíchána očkovací kličkou do připraveného roztoku.
4. Takto připravený roztok byl zvlákněn metodou elektrostatického zvláknování z tyčky (obr. 11) při napětí 23 kV. Jako podklad pro ukládání nanovlákněné vrstvy byla použita netkaná textilie - spunbond.
5. Spunbond s nanovlákněnou vrstvou byl uzavřen do Petriho misky a umístěn do inkubátoru při teplotě 27°C po dobu 72 hodin. Kvůli potřebné vlhkosti ke kultivaci kvasinek byl pod vzorek umístěn navlhčený spunbond.

Výsledky:

Vzorek po vyndání z inkubátoru nejevil žádné známky kultivace kvasinek.

2.3.2. Testování na povrchu nanovlákněné vrstvy

Cílem tohoto experimentu byla kultivace kvasinek na povrchu nanovlákněné vrstvy vyrobené ze směsi PVA a sladinkového agaru.

Experiment č. 1

Příprava materiálu a zvláknování roztoku je popsána v kapitolách 2.1 a 2.2. Pro testování byl zvolen vzorek 7 (viz tabulka 4).

Parametry elektrostatického zvláknování:

Teplota vzduchu v laboratoři byla 20°C a relativní vlhkost vzduchu 49 %. Vzdálenost kolektoru od kapiláry 10 cm. Použitý typ polymeru 10% vodný roztok PVA s podílem sladinkového agaru v hmotnostním poměru 30% agar/PVA. Kritické napětí bylo 21,2 kV a napětí při zvláknování dosáhlo hodnoty 23,4 kV.

Postup:

1. Příprava zvlákňovaného roztoku (viz podkapitola 2.1.).
2. Připravený roztok byl zvlákňován metodou elektrostatického zvlákňování z tyčky při napětí 23,4 kV. Jako podklad pro ukládání nanovlákněné vrstvy byla použita netkaná textilie – spunbond.
3. Na povrch vyrobené vrstvy byla nanесena očkovací kličkou část kvasničné kultury.
4. Takto připravený vzorek byl umístěn do Petriho misky a vložen do inkubátoru na 72 hodin při teplotě 27°C.

Výsledky:

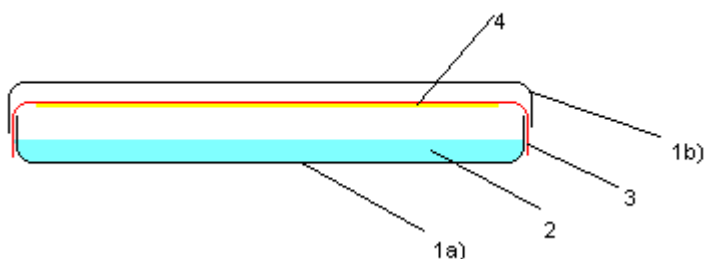
Vzorek po vyndání z inkubátoru nejevil žádné známky kultivace kvasinek.

Experiment č. 2

Druhý pokus obsahoval všechny kroky jako v předchozím experimentu s rozdílem v uchovávání vzorku v inkubátoru.

Při snaze dosáhnout při kultivaci vyšší vlhkosti, bylo do Petriho misky pod vzorek umístěno malé množství vody. Schéma uspořádání je na obr. 19.

Takto připravený vzorek byl vložen do inkubátoru na dobu 72 hodin za teploty 26,7°C.



Obrázek 19 *Schéma uspořádání Petriho misky při experimentu č. 2.* 1 – Petriho miska, 2 – voda, 3 – podkladová textilie (spunbond), 4 – nanovlákněná vrstva s nanesenými kvasinkami.

Výsledky:

Vzorek po vyndání z inkubátoru nejevil žádné známky kultivace kvasinek.

3. Diskuze výsledků

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo, najít nejvyšší hmotnostní poměr sladinkového agarů v PVA k výrobě nanovlákněné vrstvy pomocí elektrostatického zvlákňování.

Zvlákňování probíhalo při teplotách roztoků 20°C a 50°C. Hodnoty kritického napětí a napětí při zvlákňování ukázaly, že s vyšší teplotou lze dosáhnout vyššího hmotnostního poměru agarů v PVA. Při nižší teplotě začíná agar v roztoku tuhnout – gelovatět, čímž se zvyšuje viskozita roztoku a je potřeba vyššího napětí k elektrostatickému zvlákňování.

Při teplotě roztoku 50°C došlo ke zvlákňování roztoku s nejvyšším hmotnostním poměrem sladinkového agarů a to 35% agar/PVA. Při teplotě 20°C se pro elektrostatické zvlákňování jevil jako nejvhodnější vzorek 7 s hmotnostním podílem 30% agar/PVA, který byl použit pro výrobu nanovlákněné vrstvy k testování kultivace kvasinek na povrchu vrstvy. Pro přípravu směsi a následné zvlákňování byl nejvhodnější 10 % vodný roztok PVA, kde bylo dosaženo nejvyššího hmotnostního podílu agarů v PVA a struktura vláken byla bez defektů.

Metoda inkorporace kvasinek do vodného roztoku PVA prokázala, že lze pomocí elektrostatického zvlákňování kvasinky vnést přímo do nanovláken nebo do nanovlákněné vrstvy. Po tomto procesu kvasinky neztratily schopnost kultivace. Následkem této skutečnosti bylo vytvořeno vyhodnocení procenta zvlákňovaných a přeživších kvasničných buněk v nanovlákněné vrstvě. Díky možnosti vyhodnocení tohoto kritéria je možné dále testovat různé faktory při tomto experimentu.

Ve zvlákňěné vrstvě z vodného roztoku PVA u kvasinek nedošlo ke kultivaci z důvodu nedostatku živné půdy.

Z tohoto důvodu byla zvolena další metoda inkorporace kvasinek do nanovlákněné vrstvy. Do zvlákňovaného roztoku byl přidán sladinkový agar, který měl kvasinkám poskytnout živnou půdu v nanovlákněné vrstvě. Ani tato metoda nezajistila kultivaci kvasinek v připravené vrstvě. Příčinou mohlo být nedostatečné množství sladinkového agarů v nanovlákněch nebo nedostatek vlhkosti, která je pro množení kvasinek důležitá.

Další možností inkorporace kvasinek do nanovlákněné vrstvy elektrostatickým zvlákňováním by mohlo být použití jiného zařízení nebo materiálů pro zvlákňování. Jednou z možných variant by mohla být výroba bikomponentních (dvousložkových) nanovláken pomocí koaxiálního zvlákňování, kdy jedna složka tvoří jádro a druhá plášť. V tomto případě by mohl být použit sladinkový agar do jádra vlákna, kde by byly zároveň vneseny kvasinky a jako plášť by byl použit vhodný hydrofilní polymer.

Pro výrobu scaffoldů má velký význam výroba nanovlákněných 3D struktur. Vzhledem k tloušťce 3D nosiče je třeba složitých metod k osidlování nosiče buňkami. Při tvorbě nanovlákněných 3D struktur by mohly být kvasničné buňky metodou inkorporace do nanovlákněné vrstvy vneseny a kultivovány přímo v celém objemu vytvořené struktury.

Použité metody pro kultivaci kvasinek na povrchu nanovlákněné vrstvy vyrobené ze směsi PVA a sladinkového agaru neprokázaly účelnost. Důvodem mohl být nedostatek vlhkosti pro kultivaci kvasinek a nedostatečné množství živné půdy v nanovlákněné vrstvě.

Možným řešením nedostatečné vlhkosti při kultivaci kvasinek na povrchu nanovlákněné vrstvy s přídavkem sladinkového agaru je volba jiného polymeru, který není rozpustný ve vodě a současně je kvasničnými buňkami dobře snášen. Tato úprava by umožnila zvlhčování testované vrstvy.

4. Závěr

Při elektrostatickém zvlákňování roztoků s různým hmotnostním poměrem sladinkového agaru a PVA bylo zjištěno, že při vyšší teplotě roztoku lze dosáhnout nižších hodnot kritického napětí a napětí při zvlákňování. Při vyšší teplotě roztoku lze dosáhnout vyššího hmotnostního poměru sladinkového agaru.

Pro výrobu nanovlákněné vrstvy s příměsí sladinkového agaru nejvíce vyhovoval 10 % vodný roztok PVA.

Při tvorbě nanovlákněné vrstvy za teploty roztoku 50°C byl elektrostaticky zvlákněn nejvyšší hmotnostní podíl sladinkový agar/PVA 35 %. Za teploty roztoku 20°C byl elektrostaticky zvlákněn nejvyšší hmotnostní podíl sladinkový agar/PVA 30%. Tyto hodnoty byly zjištěny pro výrobu nanovlákněné vrstvy určené k dalšímu testování. Pro statistické vyhodnocení by bylo třeba provést více experimentů.

Biologické testování uvnitř nanovlákněné vrstvy metodou inkorporace kvasničných buněk přímo do nanovlákněné vrstvy pomocí elektrostatického zvlákňování prokázalo, že určité procento kvasinek je schopno po tomto procesu kultivace. Vyhodnocením této metody bylo zjištěno, že procento zvlákněných a přeživších kvasničných buněk bylo pouze 0,05 %.

Kultivace kvasničných buněk přímo v nanovlákněné vrstvě se nezdařila.

Kultivace kvasinek na povrchu nanovlákněné vrstvy vyrobené z roztoku s přídavkem sladinkového agaru byla neúspěšná.

Ve spolupráci s paní Mgr. Dagmar Matoulkovou z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze byly zpracovány základní metody práce s kvasinkami a vytvořeny návody na cvičení pro předmět Zdravotnické textilie (viz příloha).

5. Seznam literatury

- [1] *David Rigby Associates* [online]. 2011 [cit. 2011-04-25]. Technical Textiles and Nonwovens: World Market Forecasts to 2010. Dostupné z WWW: <<http://davidrigbyassociates.co.uk/DRA%20WEBSITE%2003/assets/TTandN.pdf>>.
- [2] AMLER, Evžen, et al. *Lékařské textilie : 1.díl*. Praha : Ustav experimentální medicíny AV ČR, 2008. 64 s.
- [3] LUKÁŠ, David, et al. *Lékařské textilie : 2. díl*. Praha : Asociace inovačního podnikání, 2008. 248 s.
- [4] Nanovláknó. *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 1.5.2007, last modified on 5.11.2010 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Nanovl%C3%A1kno>>.
- [5] RŮŽIČKOVÁ, Jana. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2006. 54 s.
- [6] LUKÁŠ, David, et al. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 2009, 41, 2, s. 59-140.
- [7] RAMAKRISHNA, S., et al. *An Introduction to Electrospinning and nanofibers*. Singapore : World Scientific Publishing Co., 2005.
- [8] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury*. Praha, 2007. 2 s. Synopse přednášky. Univerzita Karlova v Praze.
- [9] FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, VFU. *Praktika z veterinární mikrobiologie*. Brno, 2010. 6 s. Praktikum. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- [10] Agar. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 8.2.2007, last modified on 14.4.2011 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Agar>>.

- [11] *Pivní rodokmen* [online]. 2000 [cit. 2011-04-25]. Kvasinky. Dostupné z WWW: <http://www.pivnirodokmen.cz/kvasinky.html>.
- [12] *Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita* [online]. 2005 [cit. 2011-04-25]. Pivovarské kvasinky v moderních biotechnologiích. Dostupné z WWW: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivokvas/pivokvas.html>.
- [13] Pivovarské kvasinky. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 21.8.2008, last modified on 11.7.2010 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Pivovarsk%C3%A9_kvasinky.

6. Seznam obrázků

Obrázek 1 <i>Procentuální podíl objemu spotřeby technických textilií podle aplikace výrobků</i>	12
Obrázek 2 <i>Schéma elektrostatického zvlákňování</i> [6]. (1) stříkačka s dávkovací pumpou, (2) kapilára sloužící jako elektroda, (3) stabilní část zvlákňování, (4) zóna bičování, (5) kolektor, (6) uzemnění, (7) vysoké napětí.	15
Obrázek 3 <i>Schéma zvlákňování z tyčky</i> . (1) zdroj vysokého napětí, (2) kapilára, (3) Taylorovy kužely tvořené z kapky roztoku, (3) uzemněný kolektor.	16
Obrázek 4 <i>Technologie nanospider</i> . (1) váleček do kterého je přivedeno vysoké napětí, (2) lázeň s polymerním roztokem, (3) vznikající nanovlákna, (4) podkladová textilie, (5) uzemněný kolektor.	17
Obrázek 5 <i>Laminární box zn. TELSTAR</i>	19
Obrázek 6 <i>Inkubátor s řízenou teplotou zn. MELAG</i>	20
Obrázek 7 <i>Inverzní mikroskop</i>	20

Obrázek 8 <i>Stavba kvasinky [11].</i>	23
Obrázek 9 <i>Buňky kvasinek (Saccharomyces carlsbergensis).</i>	24
Obrázek 10 <i>Příprava roztoků. (1) elektrický vařič, (2) roztok v lázni, (3) hřidelové míchadlo.</i>	26
Obrázek 11 <i>Zařízení pro zvlákňování z tyčky. (1) přívod ke zdroji vysokého napětí, (2) kapilára, (3) kolektor, (4) uzemnění.</i>	27
Obrázek 12: A - <i>Závislost kritického napětí na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 20°C. B - Závislost kritického napětí na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 50°C. C - Závislost napětí při zvlákňování na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 20°C. D - Závislost napětí při zvlákňování na hmotnostním poměru agar/PVA při zvlákňování roztoku o teplotě 50°C.</i>	29
Obrázek 13 <i>Snímky nanovlákněné vrstvy ze vzorku 7 (viz tab.4) z elektronového rastrovacího mikroskopu.</i>	30
Obrázek 14 <i>Rastrovací elektronový mikroskop Tescan VEGA II XMU použitý pro pozorování morfologie zvlákněného materiálu.</i>	30
Obrázek 15 <i>Schématický postup vyhodnocení testování uvnitř vrstvy. A – vodný roztok PVA obsahující kvasinky. B – Rozměr a hmotnost testované vrstvy. C – Narostlé kolonie po 72 hodinách v inkubátoru.</i>	33
Obrázek 16 <i>Buňky pivovarské kvasinky uvnitř nanovláknů.</i>	34
Obrázek 17 <i>Buňky pivovarské kvasinky v nanovlákněné vrstvě.</i>	34
Obrázek 18 <i>Bürkerova komůrka.</i>	35

Obrázek 19 <i>Schéma uspořádání Petriho misky při experimentu č.2.</i> 1 – Petriho miska, 2 – voda, 3 – podkladová textilie (spunbond), 4 – nanovlákná vrstva s nanesenými kvasinkami.	37
---	----

7. Seznam tabulek

Tabulka 1 <i>Spotřeba technických textilií – objem (udáváný v 1000 tun) a tempo růstu (udávané v %) v letech 1995 – 2010. [1]</i>	9
---	---

Tabulka 2 <i>Objem spotřeby (udáváný v 1000 tun) a tempo růstu (udávané v %) v letech 1995 – 2010 pro různé aplikace.</i>	11
---	----

Tabulka 3 <i>Hmotnostní podíly PVA a vody při přípravě 20 g roztoku.</i>	26
--	----

Tabulka 4 <i>Hmotnostní podíly PVA a sladinkového agaru v 20 g roztoku, kritické napětí a napětí při zvlákňování.</i>	28
---	----

8. Seznam příloh

Návody na cvičení z předmětu Zdravotnické textilie.

PŘÍLOHA

Návody na cvičení z předmětu Zdravotnické textilie.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

NÁVODY

Očkování kultury kvasinek

Před každou kultivací (rozmnožením) kvasinek je nutné kvasinky přenést z uchovávacího (zásobního média) na nové pevné, popř. tekuté médium. Přenosu mikroorganismů se říká očkování. Existují různé metody očkování mikroorganismů, pro něž jsou společná pravidla sterilní práce, aby se do nové půdy dostal pouze sledovaný mikroorganismus a nikoliv kontaminace z prostředí (vzduch, pracovní plocha, ruce atd.).

Podle účelu kultivace lze použít několik postupů:

- a) Očkování ze zásobního šikmého agaru na nový šikmý agar (přeočkování kultury za účelem jejího uchovávání).
- b) Očkování ze zásobního šikmého agaru na pevnou půdu na Petriho misce (za účelem získání hustého nárůstu pro další kultivace).
- c) Očkování z Petriho misky do tekutého média.
- d) Očkování ze zásobního šikmého agaru na pevnou půdu na Petriho misce za účelem izolace samostatných kolonií (tzv. křížový roztěr).
- e) Nepřímé stanovení počtu životaschopných buněk – očkování z tekuté půdy, ředění a očkování na Petriho misky.
- f) Přímé stanovení živých a mrtvých buněk kvasinek – vitální test.
- g) Stanovení počtu kvasničných buněk v Bürkerově komůrce.

1. CVIČENÍ

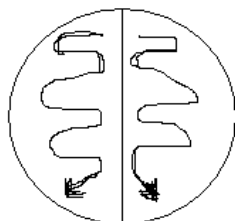
1) Očkování ze zásobního šikmého agaru na pevnou půdu na Petriho misce (za účelem získání hustého nárůstu pro další kultivace).

Pomůcky: kahan, očkovací klička (popř. sterilní plastové kličky), stojánek na zkumavky a očkovací kličky, zásobní šikmý agar s kulturou kvasinek, Petriho misky s agarem

Postup:

- 1) Na stůl laminárního boxu si připravíme stojan se zkumavkami, v nichž je na šikmém agaru narostlá kultura kvasinek a Petriho misky s připraveným pevným médiem.
- 2) Vyjmeme kličku z obalu tak, abychom se jejím koncem s očkem nedotkli rukou ani žádného předmětu.

- 3) Otevřeme zkumavku s kulturou, ožihneme hrdlo, nabere malé množství kultury na kličku, ožihneme hrdlo zkumavky nad plamenem a zátku a uzavřeme zkumavku.
- 4) Otevřeme petriho misku a několika jemnými tahy rozetřeme kulturu po agaru (obr.1).
- 5) Zavřeme Petriho misku a necháme ji inkubovat v inkubátoru v poloze dnem vzhůru.



Obrázek 1 Způsob očkování kultury na Petriho misku – cílem je získání většího množství kultury pro další práce; příklad očkování 2 různých kmenů na jednu misku; při očkování jednoho kmene se hádek “nakreslí” přes celou plochu misky.

2) *Očkování ze zásobního šikmého agaru na pevnou půdu na Petriho misce za účelem izolace samostatných kolonií (tzv. křížový roztěr)*

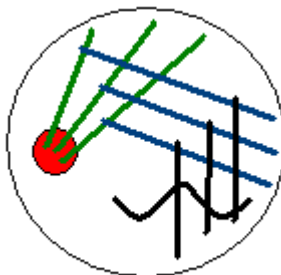
Princip metody spočívá v postupném vyředňování původní husté kultury tak, aby na konci vyrůstaly na tuhém médiu jednotlivé kolonie kvasinek. Po agaru rozetřeme stále menší a menší množství kvasničných buněk. V místě tzv. hádku již vyrůstají jednotlivé kolonie, u kterých lze hodnotit např. charakteristický profil, tvar, barvu, okraje apod. Kolonie je potomstvo jedné původní buňky. Tato metoda se používá v případě směsných kultur s cílem získat čisté kultury.

Pomůcky: kahan, očkovací klička (popř. sterilní plastové kličky), stojánek na zkumavky a očkovací kličky, zásobní šikmý agar s kulturou kvasinek, Petriho misky s agarem

Postup:

- 1) Na stůl laminárního boxu si připravíme stojan se zkumavkami, v nichž je na šikmém agaru narostlá kultura kvasinek, a Petriho misky s připraveným pevným médiem.
- 2) Vyjmeme kličku z obalu tak, abychom se jejím koncem s očkem nedotkli rukou ani žádného předmětu.
- 3) Otevřeme zkumavku s kulturou, ožihneme hrdlo zkumavky nad plamenem.
- 4) Nabere malé množství kultury na kličku, ožihneme hrdlo zkumavky a zátku nad plamenem, uzavřeme zkumavku.

- 5) Otevřeme Petriho misku a na kraji agaru rozetřeme kličkou kulturu na plochu velkou přibližně 10 x 10 mm, odložíme použitou kličku.
- 6) Vezmeme novou plastovou kličku a přes hustý nátěr provedeme 3 čáry (obr. 2).
- 7) Znovu vezmeme novou kličku a provedeme tři čáry kličkou přes čáry původní (nejprve přes všechny tři předešlé čáry, podruhé jen přes dvě a naposledy přes jednu).
- 8) Předchozí krok zopakujeme a bez výměny kličky uděláme na zbývající ploše misky přes nové čáry kličkou hádka.
- 9) Zavřeme Petriho misku a necháme ji inkubovat v inkubátoru v poloze dnem vzhůru.



Obrázek 2 Schéma křížového roztěru kultury na Petriho misku s agarem. Každá barva značí použití nové (nebo vyžihané) kličky.

3) *Přímé stanovení živých a mrtvých buněk kvasinek – vitální test*

Stanovení procenta živých a mrtvých buněk má v praxi důležitou roli při stanovení jakosti pekařského droždí nebo kontrole pivovarských kvasnic během technologického procesu.

K přímému stanovení se využívají některá netoxická barviva, nejčastěji methylenová modř, která zbarví mrtvé buňky modře, živé buňky zůstávají nezbarveny.

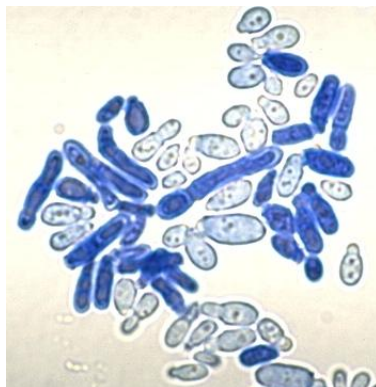
Pomůcky: podložní a krycí skla, roztok metylenové modři

Postup:

- 1) Do středu podložního skla přeneseme kapku roztoku methylenové modři a důkladně v ní rozetřeme kličku kultury kvasinek
- 2) Preparát překryjeme krycím sklíčkem a ihned pozorujeme ve světelném mikroskopu, ideálně při zvětšení 10 x 45
- 3) Spočítáme zbarvené a nezbarvené buňky

Hodnocení:

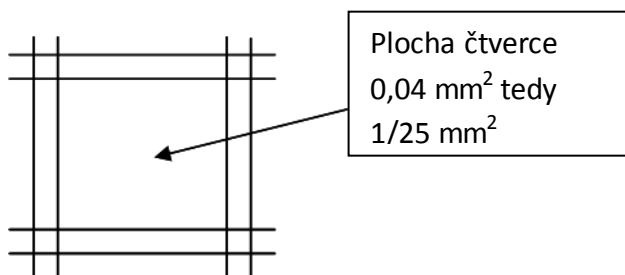
Mrtvé buňky se barví modře (obr. 3). Počítáme živé a mrtvé buňky ve dvaceti zorných polích vitálního preparátu, počet mrtvých buněk vyjádříme % celkového počtu kvasinkových buněk. Možné je využití Bürkerovy počítací komůrky, viz . dále.



Obrázek 3 Buňky v methylenové modři.

4) Stanovení počtu kvasničných buněk v Bürkerově komůrce

Počítací Bürkerova komůrka je speciální mikroskopické sklíčko, ve kterém je vybroušena mikroskopická počítací mřížka s přesně danou hloubkou zářezů. Zářezy tvoří různě velké čtverce a obdélníky o definované ploše (obr. 4). Prostor mezi podložním a krycím sklíčkem má u různých komůrek různou hloubku (např. 0,1 mm) a je na komůrce vždy vyznačen. Pracujeme tedy s určitým objemem vzorku. Plocha čtverečku je $0,04 \text{ mm}^2$ (tedy $1/25 \text{ mm}^2$). Při hloubce komůrky 0,1 mm je objem nad každým čtverečkem $0,004 \text{ mm}^3$ ($1/250 \text{ mm}^3$). Známe objem vzorku a ředění, počet buněk dopočítáváme většinou na objem 1 ml.



Obrázek 4 Zářezy v Bürkerově komůrce.

Pomůcky: Světelný mikroskop, počítací Bürkerova komůrka, krycí sklíčko, pipeta (případně kapátko), kalibrovaná zkumavka se stupnicí, destilovaná voda, vortex

Postup:

- 1) Připravíme si suspenzi buněk vhodnou pro počítání v Bürkerově komůrce.
- 2) Suspenze, ve které máme stanovovat počet buněk, důkladně zhomogenizujeme pomocí vortexu, aby se netvořili shluky buněk.
- 3) Pipetou přeneseme kapku suspenze do prostoru na podložním sklíčku tak, aby se zaplnil celý prostor s počítací mřížkou.
- 4) Počítáme buňky v jednotlivých políčkách (čtvercích) stále stejným postupem - vždy zahrnujeme do obsahu jednoho políčka buňky ležící na 2 sbíhajících se stranách (např. na levé a dolní straně). Kvasinky, dotýkající se pravé a horní strany políček do počtu nezahrnujeme. Je nutno spočítat buňky ve větším počtu políček (např. 10) z různých částí komůrky (postupujeme po řadách, vždy jedním směrem, abychom nepočítali opakovaně stejná políčka).
- 5) Z počtu buněk v 10 čtvercích vypočítáme aritmetický průměr a výsledek přepočítáme na skutečnou koncentraci buněk v původní suspenzi, příklad výpočtu níže.

Příklad výpočtu:

Průměrný počet kvasinkových buněk v 10 čtvercích celkem 186. Čtverec = plocha $1/25 \text{ mm}^2$, objem nad 1 čtvercem = $0,04 \text{ mm}^3$ ($1/250 \text{ mm}^3$), ředění suspenze = 12 x. Počet buněk v 1 ml původní suspenze = $186 \cdot 250 \cdot 1000 \cdot 12 = 55\,800\,000 = 5,58 \cdot 10^8$ buněk.

Poznámka:

186 = celkový počet buněk

x 250 = objem nad 1 čtvercem

x 1000 = přepočet na 1 ml ($1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$)

x 12 = suspenze byla na počátku ředěna 12 x

2. CVIČENÍ

1) Nepřímé stanovení počtu životaschopných buněk – očkování z tekuté půdy, ředění a očkování na Petriho misky

Počet buněk lze nepřímo stanovit pomocí kultivace a počítání kolonií vyrostlých na Petriho miskách. Vychází se z ověřeného předpokladu, že z 1 životaschopné buňky vyrůstá 1 kolonie. Pojmem "životaschopnost" se v tomto případě rozumí schopnost kvasničné buňky vytvářet na pevné půdě viditelné kolonie. Z počtu kolonií na miskách se pak vypočte původní počet buněk v suspenzi.

Buňky se vyředí postupně tzv. desítkovým ředěním (postupné ředění suspenze vždy na 10 x nižší koncentraci sterilním fyziologickým roztokem). Konečný počet kolonií na miskách by měl být v rozmezí 30 – 200.

Pomůcky: sterilní pipety (1 ml, s dílky 0,1 ml), vortex

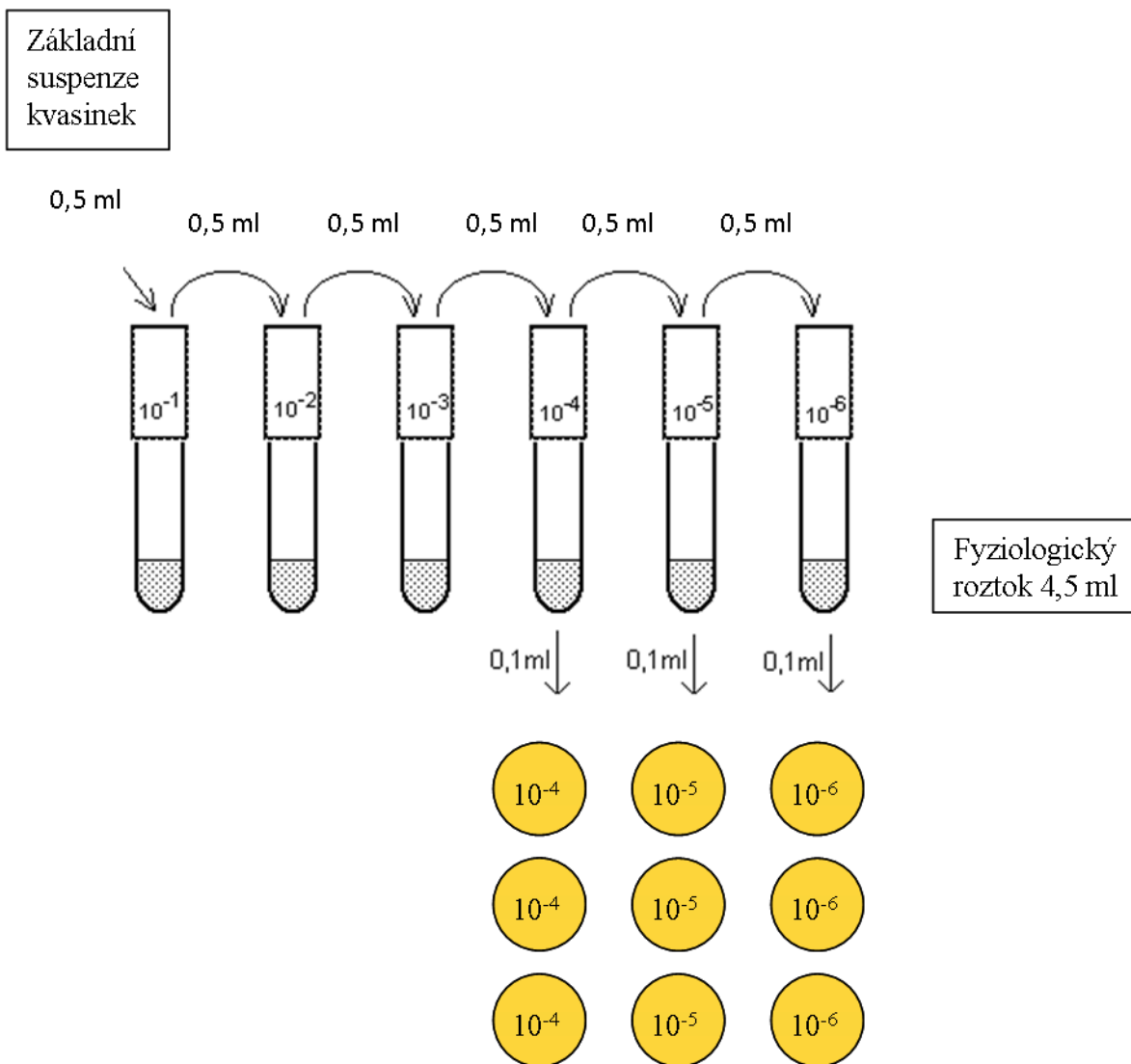
Postup:

- 1) Na stůl laminárního boxu si připravíme Petriho misku s hustým nárůstem kultury kvasinek a stojan s označenou zkumavkou s 4,5 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl).
- 2) Vyjmeme klíčku z obalu tak, abychom se jejím koncem s očkem nedotkli rukou ani žádného předmětu.
- 3) Otevřeme Petriho misku s hustým nárůstem kultury, nabereme plnou klíčku kultury a uzavřeme Petriho misku. Klíčku s kulturou stále držíme v ruce.
- 4) Druhou rukou uchopíme zkumavku s fyziologickým roztokem, sundáme zátku, ožihneme hrdlo a klíčkou, kterou stále držíme v ruce, nanese kulturu na stěnu zkumavky kousek nad hladinou fyziologického roztoku. Kulturu rozetřeme a postupně klíčkou převedeme do fyziologického roztoku.
- 5) Vyjmeme klíčku, ožihneme hrdlo zkumavky, uzavřeme zkumavku zátkou a suspenzi buněk promícháme ve vortexu.

Postup ředění buněčné suspenze:

- 1) Připravíme si stojan s 5 zkumavkami obsahujícími 4,5 ml fyziologického roztoku. Zkumavky si vhodně označíme, např. ředěním 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} atd. Do stojanu si dále připravíme zkumavku se suspenzí buněk připravenou v předchozím kroku.
- 2) Uchopíme zkumavku se suspenzí, sundáme zátku, ožihneme hrdlo, do pipety "natáhneme" 0,5 ml promíchané suspenze, vyjmeme pipetu ze zkumavky, ožihneme hrdlo zkumavky a uzavřeme ji zátkou.

- 3) Uchopíme zkumavku s fyziologickým roztokem označenou číslem 1, sundáme zátku, ožihneme hrdlo a pipetou, kterou stále držíme v pravé ruce, napipetujeme do zkumavky 0,5 ml suspenze. Vyjmeme pipetu, ožihneme hrdlo zkumavky a uzavřeme zkumavku.
- 4) Suspenzi ve zkumavce 1 promícháme a způsobem popsaným v bodech 2 a 3 pipetujeme 0,5 ml suspenze ze zkumavky 1 do zkumavky 2.
- 5) Stejným způsobem pokračujeme až do konečného ředění (obr. 5).



Obrázek 5 Desítkové ředění buněčné suspenze.

Postup očkování na Petriho misky (výsev):

- 1) Připravíme se Petriho misky s agarovou půdou. Misky řádně označíme, např. přímo ředěním 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} atd. tak, aby označení odpovídalo označení zkumavek v předchozím kroku (ředění buněčné suspenze).
- 2) Od vhodných ředění (postupně získáme odhad) si připravíme nejméně 3 misky s agarovou půdou.
- 3) Před očkováním na misky důkladně promícháme zkumavky s vybranými ředěními
- 4) Očkujeme pipetou 0,1 ml suspenze každého ředění na 3 označené Petriho misky. Napipetovaný vzorek rozetřeme po povrchu agaru sterilní hokejkou krouživým pohybem po celé ploše agaru.
- 5) Kultivujeme dnem vzhůru při teplotě 26°C po dobu 48 – 72 hodin.

Hodnocení:

K hodnocení vybereme nejvhodnější ředění, tedy takové, kde se vyskytuje 50-200 kolonií na misce (obr. 6). Spočítáme počet kolonií na všech třech miskách tohoto ředění. Kolonie počítáme ze dna misky, na němž jsou lépe vidět – kolonie můžeme při počítání označit fixou na skle misky.



Obrázek 6 Označené kolonie při hodnocení počtu životaschopných buněk.

Ze tří získaných hodnot vypočítáme průměr, číslo vynásobíme ředěním a hodnotou 10 (= desetina pipetovaného mililitru, abychom získali hodnotu pro mililitr celý). Získaný údaj je hodnota CFU (colony forming units, což je počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii, tedy počet buněk v objemu 1 ml původní suspenze).

Průměrný počet buněk x hodnota ředění (kladný index) x 10 = CFU/ml

Příklad výpočtu:

Průměrný počet buněk 134

Ředění 10^{-4}

$134 \times 10^4 \times 10 = 134 \times 10^5$ CFU/ml

V původní suspenzi tedy bylo 13,4 milionů kvasničných buněk na 1ml.

2) *Výroba piva*

Jak se vaří pivo Pilsner Urquell

Slad z ječmene se připravuje přímo v plzeňském pivovaru. Ječmen je dopraven do sladovny, kde se namáčí a nechá se pět dní klíčit. Po naklíčení se suší.

Poté se slad rozeemele na takzvaný sladový šrot. Následuje vystírání – tedy dokonalé smíchání sladového šrotu (drtě) s vodou, za vzniku řídké bílé kaše, které se říká rmut (nebo dílo). Účelem vystírání je aktivace příslušných enzymů.

Při výrobě Pilsner Urquell se používá ojedinělý třírmutový postup. Vždy 1/3 rozmíchaného sladu s vodou se přivede do kotle, kde se směs zahřívá na přesně stanovené teploty. Cílem rmutování je přeměnit rozpustné látky sladu v roztoku na sladové cukry. Výsledkem procesu je tzv. sladina.

Scezování zbaví rmut nerozpustitelných látek sladu - mláta, které se usadí na perforovaném dně kádě. Přes takto vzniklý přirozený filtr je přefiltrován celý obsah do mladinového kotle.

Var sladiny s chmelem se nazývá chmelovarem. Chmel se během chmelovaru přidává ve třech dávkách. Chmel (používají se šišky samičích květů, které pivu propůjčují svou specifickou hořkost a aroma) se přidává ve formě chmelových pelet, což jsou vlastně šetrně rozemleté chmelové šišťice zbavené balastních látek. Chmelovar musí být velmi intenzivní, aby pivo získalo tu správnou hořkost.

Zchlazená mladina se musí před přidáním kvasnic okysličit, aby se v ní kvasničné buňky pomnožily. Při výrobě Pilsner Urquell se uplatňuje speciální kmen kvasinek, který se využívá už od roku 1842. Tyto originální kmen kvasinek se uchovává v chlazeném trezoru.

Během kvašení kvasnice přeměňují cukry získané na varně na alkohol a CO₂. Kvašení trvá 12 dní, pak se „mladé pivo“ přečerpá, „sduje“ do ležáckých tanků, kde zraje při nízkých teplotách asi 30 dní.

Hotové pivo se přefiltruje s využitím tzv. membránové filtrace a stáčí se do sudů, lahví, plechovek a cisteren. Pivo stáčené do sudů, lahví a plechovek se před stáčením pasterizuje. Pivo v cisternách, určené pro rychlou spotřebu, pasterizované není [\[http://www.pilsner-urquell.cz\]](http://www.pilsner-urquell.cz).

Domácí výroba piva

Vaření piva z koncentrátu je od klasické výroby z ječného sladu velice snadný. Postupy při výrobě piva z koncentrátu se liší podle výrobce a druhu piva. Setkáte se s koncentráty ze kterých se dá vyrobit například pivo typu ležák, plzeňské, pšeničné, bitter...

Jednoduše řečeno, k mladinovému koncentrátu stačí přidat vodu a kvasnice. Zamíchat, nechat vykvasit a stočit do lahví.

Všeobecný návod na výrobu svrchně kvašeného domácího piva z mladinového koncentrátu:

1. Očistěte a sterilizujte celé vybavení pro výrobu piva.
2. Konzervu s koncentrátem postavte do horké vody asi na 5 minut (zahřátý koncentrát se lépe vylévá).
3. Do fermentační nádoby (obr. 7) nalijte 3,5 litru horké vody. Přelijte obsah konzervy do fermentační nádoby a míchejte.

4. Přidejte 0,5 - 1 kg dextrózy (obchodní název pro glukózu). Její množství ovlivní obsah alkoholu v pivu. Dále můžete přidat sladový extrakt – Maltózu (rozpuštěnou ve studené vodě), která dodá pivu plnost a vyšší hustotu.
5. Doplňte fermentační nádobu studenou vodou do objemu, který je udán výrobcem (podle druhu koncentráту). Důkladně rozmíchejte.
6. Kvasinky přidejte za teploty v nádobě 20°C. Mohou být půl hodiny předem rozmíchané v 1dcl vody o pokojové teplotě s přidavkem 1 lžičky dextrózy.
7. Uzavřete fermentační nádobu a naplňte kvasnou zátku (obr. 8) vodou.
8. Fermentace probíhá 4-10 dní za teploty 18-20°C. Fermentace bude ukončena, když v kvasné zátce ustanou bubliny.
9. Po fermentaci stočte pivo do lahví. Před stáčením vložte do lahve fermentační drops (1ks na 0,5 l piva).
10. Uložte lahve na teplé místo po dobu 10ti dní, nastane sekundární fermentace.
11. Přesuňte lahve na chladné místo na 21 dní nebo do okamžiku, kdy je pivo čiré a kvasinky jsou usazené na dně.



Obrázek 7 Fermentační nádoba.



Obrázek 8 Kvasná zátka.